

#5-4/17/02
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re U.S. Patent Application of)
YOSHIBA *et al.*)
Application Number: To Be Assigned)
Filed: Concurrently Herewith)
For: TRANSGENIC RICE PLANT AND ITS FAMILY WITH)
ENVIRONMENTAL STRESS RESISTANT BY PROLINE)
ACCUMULATION OF HIGH LEVEL AND ITS)
PRODUCTION)

J1036 U.S. PTO
10/026767
12/27/01

Honorable Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231

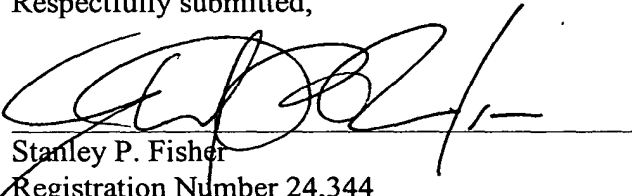
**REQUEST FOR PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. § 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of June 8, 2001, the filing date of the corresponding Japanese patent application 2001-174553.

The certified copy of corresponding Japanese patent application 2001-174553 is being submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copies is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,


Stanley P. Fisher
Registration Number 24,344

REED SMITH HAZEL & THOMAS LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200
December 27, 2001

JUAN CARLOS A. MARQUEZ
Registration No. 34,072

**PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT**

J1036 U.S. PTO

10/026767



This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this office.

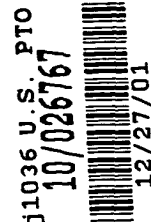
Date of Application : June 8, 2001
Application Number : Patent Application No. 174553 of 2001
Applicant (s) : Hitachi, Ltd.,
Bio-oriented Technology Research Advancement
Institution,
Independent Administrative Institute
Japan International Research Center for
Agricultural Sciences,
and RIKEN.

Dated this 26th day of November, 2001

Kouzou OIKAWA
Commissioner,
Patent Office

Certificate No. 2001-3103583

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 6月 8日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-174553

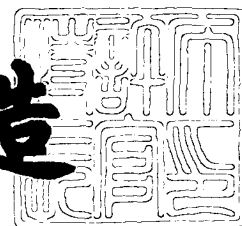
出 願 人
Applicant(s):

株式会社日立製作所
生物系特定産業技術研究推進機構
独立行政法人国際農林水産業研究センター
理化学研究所

2001年11月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3103583

【書類名】 特許願

【整理番号】 NT01P0353

【提出日】 平成13年 6月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所 中央研究所内

【氏名】 吉羽 洋周

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大わし 1 - 1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内

【氏名】 篠崎 和子

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢二番一号 理化学研究所内

【氏名】 篠崎 一雄

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社日立製作所

【特許出願人】

【識別番号】 000195568

【氏名又は名称】 生物系特定産業技術研究推進機構

【特許出願人】

【識別番号】 501174550

【氏名又は名称】 独立行政法人国際農林水産業研究センター

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100068504

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 勝男

【電話番号】 03-3661-0071

【選任した代理人】

【識別番号】 100086656

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 恭助

【電話番号】 03-3661-0071

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 081423

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9003094

【包括委任状番号】 9403294

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プロリン蓄積能力の高いイネ科植物およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に記載の配列を含むイネの P 5 C S (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) 遺伝子が導入されたことを特徴とするイネ科植物。

【請求項 2】

配列番号 2 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P 5 C S (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) 遺伝子が導入されたことを特徴とするイネ科植物。

【請求項 3】

配列番号 3 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P r o D H (プロリン脱水素酵素) 遺伝子のアンチセンス (逆向きな塩基配列を持つ) 遺伝子が導入されたことを特徴とするイネ科植物。

【請求項 4】

配列番号 1 に記載の配列を含むイネの P 5 C S 遺伝子または配列番号 2 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子と配列番号 3 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P r o D H 遺伝子のアンチセンス遺伝子とが導入されたことを特徴とするイネ科植物。

【請求項 5】

配列番号 1 に記載の配列を含むイネの P 5 C S 遺伝子または配列番号 2 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子と配列番号 3 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P r o D H 遺伝子のアンチセンス遺伝子とがタンデムに連結されて導入されたことを特徴とするイネ科植物。

【請求項 6】

配列番号 1 に記載の配列を含むイネの P 5 C S 遺伝子、配列番号 2 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子、配列番号 3 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P r o D H 遺伝子のアンチセンス遺伝子の何れか、あるいは、前記イネ又はシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子と前記シロイヌナズナの P r o D H 遺伝子のアンチセンス遺伝子とがタンデムに連結されて取り込まれていることを特

徴とするベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターをイネ科植物由来のカルスに導入し、前記カルスを増殖させた後に、前記カルスから植物体を再分化させて得られることを特徴とするイネ科植物。

【請求項 8】

請求項 6 に記載のベクターをイネ科植物由来のプロトプラストに導入し、前記プロトプラストを増殖させたコロニーから植物体を再分化させて得られたことを特徴とするイネ科植物。

【請求項 9】

請求項 6 に記載のベクターを遺伝子操作により導入して得られたイネ科植物の交雑によって得られ、請求項 6 に記載のベクターが導入されたことを特徴とするイネ科植物。

【請求項 10】

請求項 1 から請求項 9 の何れかに記載のイネ科植物がイネであることを特徴とするイネ科植物。

【請求項 11】

請求項 1 から請求項 9 の何れかに記載のイネ科植物から収穫されたことを特徴とするイネ科植物の種子。

【請求項 12】

請求項 1 から請求項 9 の何れかに記載のイネ科植物がイネであり、前記イネから収穫されたことを特徴とするイネ科植物の種子。

【請求項 13】

請求項 6 に記載のベクターをイネ科植物由来のカルスにアグロバクテリウムを用いて導入し、前期カルスを増殖させた後に、前記カルスから植物体を再分化させることを特徴とするイネ科植物の製造方法。

【請求項 14】

請求項 6 に記載のベクターをイネ科植物由来のプロトプラストに電気パルスの印加により導入し、前記プロトプラストを増殖させたコロニーから植物体を再分

化させることを特徴とするイネ科植物の製造方法。

【請求項 1 5】

請求項 6 に記載のベクターを遺伝子操作により導入して得られたイネ科植物と交雑を行い、請求項 6 に記載のベクターが導入されたことを特徴とするイネ科植物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロリン蓄積能力が高く、耐塩性・耐乾燥性・耐冷性が向上したイネ科植物、及びその製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

塩生植物を含む幾つかの植物において、植物が高塩ストレスや乾燥ストレスを受けると細胞内にアミノ酸の 1 つであるプロリンを蓄積することが知られている。これは、蓄積したプロリンが植物細胞内の浸透圧調節やストレスによる機能タンパク質の変性を抑えるのに役立っていると考えられている。植物におけるプロリンは、 Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素 (P 5 C S) と Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸還元酵素 (P 5 C R) の 2 つの酵素によってグルタミン酸から合成される。一方、プロリンはプロリン脱水素酵素 (P r o D H) と Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素 (P 5 C D H) の 2 つの酵素によってグルタミン酸へと分解される。

【0 0 0 3】

上記の植物では、高塩ストレスや乾燥ストレスなどの水ストレス（水を吸収しにくい状態）を受けると P 5 C S 遺伝子の発現レベルが上昇し、P 5 C S が活性化するが、P 5 C R 活性およびその遺伝子発現は、一定で低いレベルにある。また、代謝系の遺伝子発現および酵素活性も抑制された状態になる。ところが、一旦水ストレスが解除されると、今度は逆に合成系の遺伝子発現と酵素活性が抑制され、P r o D H 遺伝子の発現が急速に誘導され、酵素活性も高まり、細胞内に蓄積されていたプロリンは速やかにグルタミン酸へと代謝される。

【 0 0 0 4 】

以上のことから、水ストレス時におけるプロリン合成はP 5 C Sが律速となっており、また水ストレス解除後のプロリン代謝にはP r o D Hが律速となっておりと考えられる (YoshidaらPlant Cell Physiol. 38:1095-1102(1997))。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

地球環境の悪化に伴って乾燥、半乾燥による塩類土壌の増加や人口増加による食料不足が今後益々深刻化することが予想される。高塩ストレス、乾燥ストレス及び低温ストレス（水を吸収しにくい状態）耐性作物の育種は、世界の食料問題を解決する上で重要な役割を果たすものとして、各方面から研究が進められ、その成果が期待されている。

【 0 0 0 6 】

本発明の目的は、植物のプロリン合成系及び代謝系の律速酵素である Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素 (P 5 C S) とプロリン脱水素酵素 (P r o D H) の重要性に注目し、遺伝子組換え技術によりこれら酵素遺伝子の発現制御を行い、プロリン蓄積能力が高く、これにより耐塩性・耐乾索性・耐冷性が向上したイネ科植物、及びその製造方法を提供するところにある。

【 0 0 0 7 】.

【課題を解決するための手段】

プロリン合成系のP 5 C S遺伝子を導入して過剰に発現させたり、代謝系のP r o D H遺伝子のアンチセンス（逆向きの塩基配列を持つ）遺伝子を導入してプロリンの分解を抑制したり、P 5 C S遺伝子及びP r o D H遺伝子のアンチセンス遺伝子の両方を導入して、プロリンの分解を抑制しながらプロリン合成を促進させることにより、イネ及びイネ科植物の細胞にプロリンを高濃度蓄積させる。

【 0 0 0 8 】

本発明では、プロリンを高濃度蓄積させることにより、耐塩性、耐乾索性あるいは耐冷性を持つイネ及びイネ科植物を分子レベルで育種（分子育種）することが可能となる。

【 0 0 0 9 】

これまで、イネ及びイネ科植物において適合溶質としてのプロリン濃度を、合成促進及び分解抑制することにより、高めることを可能とした報告は知られていない。本発明の発明者らは、P5CS遺伝子とProDH遺伝子の重要性に注目し、従来知られていない新規な技術課題を解決するために、遺伝子の導入が行いやすいイネ品種の選定、カルス形成律を向上させる研究、イネ用遺伝子導入ベクターの構築の研究など各方面から研究を行い、新規な技術解明を行い本発明を完成させるに至った。

【0010】

本発明では、イネ又はシロイヌナズナ由来のプロリン合成遺伝子、プロリン代謝遺伝子のアンチセンス遺伝子を個別にあるいは組み合わせて導入して形質転換されたイネ科植物、及びその製造方法が提供される。

【0011】

本発明のイネ科植物にはアミノ酸の1つであるプロリンの合成酵素タンパク質をコードする遺伝子、プロリン分解酵素のアンチセンス遺伝子の何れか、あるいは、これら双方の遺伝子が導入されている。この構成により、耐塩性、耐乾燥性及び耐冷性が向上したイネ科植物が実現できる。更に、本発明のイネ科植物から収穫された完熟種子、特にイネの種子は、複数世代にわたって高いプロリン蓄積能力を維持していく可能性を有する点に特徴がある。

【0012】

また本発明は、イネ及びイネ科植物を対象とし、イネ科植物に属する植物であれば特に制限はない。イネ科植物に属する植物の例としては、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ライムギ、シバ、アワ、ヒエ等がある。本発明は、特に、イネに、より好適に適用できる。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の実施例のイネ科植物では、イネ又はシロイヌナズナ由来のプロリン（適合溶質）合成遺伝子とプロリン代謝遺伝子のアンチセンス遺伝子の何れか、あるいは、これら双方の遺伝子が導入されて形質転換がなされている。

【0014】

本発明の実施例のイネ科植物に導入される 1 種類の遺伝子の例としては、

(1) 列番号 1 に記載の配列 (塩基配列及びアミノ酸配列) を含むイネの P 5 C S (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) 遺伝子、

(2) 配列番号 2 に記載の配列 (塩基配列及びアミノ酸配列) を含むシロイヌナズナの P 5 C S (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) 遺伝子、

(3) 配列番号 3 に記載の配列 (塩基配列及びアミノ酸配列) を含むシロイヌナズナの P r o D H (プロリン脱水素酵素) 遺伝子のアンチセンス (逆向きの塩基配列を持つ) 遺伝子、

がある。

【 0 0 1 5 】

本発明の実施例のイネ科植物に導入される 2 種類の遺伝子の例としては、

(1) 配列番号 1 に記載の配列を含むイネの P 5 C S (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) 遺伝子又は配列番号 2 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子と、配列番号 3 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P r o D H (プロリン脱水素酵素) 遺伝子のアンチセンス (逆向きの塩基配列を持つ) 遺伝子との 2 つの遺伝子、

(2) 配列番号 1 に記載の配列を含むイネの P 5 C S (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) 遺伝子又は配列番号 2 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子と、配列番号 3 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P r o D H (プロリン脱水素酵素) 遺伝子のアンチセンス (逆向きの塩基配列を持つ) 遺伝子とがタンデム (直列) に連結されている 2 つの遺伝子、

がある。

【 0 0 1 6 】

本発明の実施例で使用されるベクターには、配列番号 1 に記載の配列を含むイネの P 5 C S (Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸合成酵素) 遺伝子、配列番号 2 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子、配列番号 3 に記載の配列を含むシロイヌナズナの P r o D H (プロリン脱水素酵素) 遺伝子のアンチセンス (逆向きの塩基配列を持つ) 遺伝子の何れか 1 つの遺伝子を取り込まれているか、あるいは、イネ又はシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子と上記のアンチセンス

遺伝子とがタンデムに連結されて2つの遺伝子を取り込まれている。

【0017】

本発明の実施例のイネ科植物は、例えば、次の何れかにより得ることができる。
(1) 上記のベクターをイネ科植物由来のカルスに導入し、このカルスを増殖させた後にカルスから植物体を再分化させる。

(2) 上記のベクターをイネ科植物由来のプロトプラストに導入し、このプロトプラストを増殖させたコロニーから植物体を再分化させる。

(3) 上記のベクターを遺伝子操作により導入して得られたイネ科植物と交雑を行う。

【0018】

本発明の実施例のイネ科植物の製造方法として、例えば次の例をあげることができる。

(1) 上記のベクターをイネ科植物由来のカルスにアグロバクテリウムを用いて導入し、このカルスを増殖させた後にカルスから植物体を再分化させる。

(2) 上記のベクターを電気パルスの印加によりイネ科植物由来のプロトプラストに導入し、このプロトプラストを増殖させたコロニーから植物体を再分化させる。

(3) 上記のベクターを遺伝子操作により導入して得られたイネ科植物と交雑を行う。

【0019】

これらの製造方法では、プロリンの蓄積能力が高くしかも耐塩性・耐乾燥性・耐冷性レベルが向上したイネ科植物の製造方法が提供される。

【0020】

また、本発明の実施例のイネ科植物から収穫された完熟した種子、特にイネの種子は、複数世代にわたって高いプロリン蓄積能力を維持していく。

【0021】

本発明の実施例のイネ科植物及びその製造方法を実現する例を、イネを代表的な例にとり、以下、手順に従って詳細に説明する。以下に説明する手順はイネ以外のイネ科植物にも、各種条件をそのまま又は変更して適用されることは言うま

でもない。

【 0 0 2 2 】

(遺伝子のクローニング)

最初に、イネ幼苗から mRNA を抽出し、この mRNA を用いて cDNA を合成する。この cDNA をプラスミドまたはファージからなるベクターと連結して宿主微生物に導入し組換え体 DNA を調整する。この組換え体 DNA が導入された形質転換微生物は、シロイヌナズナからの P 5 C S 遺伝子をプローブに用いるブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングする。イネ及びシロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子の配列は既に報告されている (Yoshida ら Plant J. (1995) 7:751-760, Igarashi ら Plant Mol. Biol. (1997) 33:857-865) ので、これをもとに適当なプライマーを設計し PCR によってスクリーニングし、目的とする形質転換体を選び出す。得られた形質転換体から目的とするプラスミドを単離し、必要があれば適当な制限酵素で切断しプラスミドベクターにサブクローニングしてクローン化する。シロイヌナズナの P 5 C S 遺伝子も、イネと同様な方法にてクローン化することができる。ただし、mRNA を抽出するサンプルは、通常の環境で育成したものよりも、高塩ストレス (250 mM NaCl 溶液などに漬ける) や乾燥ストレス処理を施したものの方が好ましい。これは、P 5 C S 遺伝子が、高塩ストレスや乾燥ストレスといった水ストレスに応答して誘導されるからである (Yoshida ら Plant J. (1995) 7:751-760, Igarashi ら Plant Mol. Biol. (1997) 33:857-865, Yoshida ら Plant Cell Physiol. (1997) 38:1095-1102)。

【 0 0 2 3 】

一方、シロイヌナズナの P r o D H 遺伝子 (配列は Kiyosue ら Plant Cell (1996) 8:1323-1335 に既に報告済み) も上述した方法によりクローン化することができる。ただし、mRNA を抽出するサンプルは、乾燥ストレスを与えた (約 10 時間処理) 後、再び水に漬けて吸水させたものあるいはプロリン溶液に漬けてプロリンを吸収させたものなどを用いるとよい。これは P r o D H 遺伝子が、水ストレスを受けている間は、その発現が抑制されていること、また高濃度のプロリンによってその遺伝子発現が誘導されるからである (Kiyosue ら Plant Cell (1996) 8:1323-1335)。

96) 8:1323-1335, Yoshidaら Plant Cell Physiol. (1997) 38:1095-1102)。

【0024】

以上のようなサンプルを用いればイネやシロイヌナズナばかりではなく他のイネ科植物からもP5CS遺伝子とProDH遺伝子の単離が可能である。

【0025】

(遺伝子導入ベクターの構築)

クローン化した各P5CS遺伝子およびProDH遺伝子は、適当な制限酵素でプラスミドから切り出し、図1に示すように、pBIベクターを改変したイネ用ベクターのカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの後に連結する。図1において、RBはライトボーダー、35SProはカリフラワーモザイクウイルスのプロモーター、P5CSはイネまたはシロイヌナズナのプロリン合成系酵素遺伝子、ProDHはシロイヌナズナのプロリン代謝系酵素遺伝子、Nosterはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター、HTPはハイグロマイシン耐性遺伝子、LBはレフトボーダーを、それぞれ表している。また、矢印は遺伝子のセンスの方向を示している。

【0026】

図1において、Aは、RB-35SPro-P5CS-Noster-35SPro-HTP-Noster-LBの順に配列したベクター（コンストラクト）を構築した例を示す図である。Bは、上記Aに対して、RB-35SPro-P5CS-Noster-35SPro-HTP-Noster-LBの順に上記Aのコンストラクトと同じように配列されるが、遺伝子P5CSがアンチセンスに配列された例を示す図である。Cは、上記Aのコンストラクトの遺伝子P5CSに代えて、遺伝子ProDHをアンチセンスに配列して置換し、RB-35SPro-ProDH（アンチセンス）-Noster-35SPro-HTP-Noster-LBの順に配列したベクターを構築した例を示す図である。Dは、上記Aのコンストラクトに、さらに、遺伝子ProDHをアンチセンスに配列し、上記Cに示すコンストラクトをタンデムに連結した、RB-35SPro-P5CS-Noster-35SPro-ProDH（アンチセンス）-Noster-35SPro-HTP-Noster-LBの順に配列したベクター

を構築した例を示す図である。

【0027】

35Sプロモーターは強力で恒常的にどの組織でも遺伝子発現を誘導するプロモーターとしてよく知られている。また、遺伝子を組み込む方向はP5CS遺伝子の場合はセンス方向に、ProDH遺伝子の場合はアンチセンス方向に連結する。

【0028】

そして各遺伝子を連結したベクターはエレクトロポレーションによりアグロバクテリウムEHA101菌に導入する。各コンストラクト（図1に示すA～D）が導入されたアグロバクテリウムはBacto Pepton（10g/l）、Bacto Yeast Extract（10g/l）、塩化ナトリウム（5g/l）、1M塩化マグネシウム（2ml/l）、ハイグロマイシンB（50mg/l）を含むYEP培地により28℃で培養し増殖させる。遺伝子導入は各コンストラクト（図1に示すA～D）を導入したアグロバクテリウムをイネのカルス細胞に感染させることにより行う。コンストラクトDは、2つの遺伝子（P5CS遺伝子とProDH遺伝子）をタンデムに連結して同時に導入するように設計されているが、コンストラクトAとCを混ぜて共感染させてもコンストラクトDと同様な効果が得られる。

【0029】

なお、各コンストラクトにはHPT（ハイグロマイシン耐性）遺伝子が連結されているが、これは導入遺伝子の効果を解析する基礎研究用として形質転換された細胞及び植物体を効率よく選抜するためのもので、実際の塩害地や乾燥地などで栽培する場合には組み込んでおく必要はない。

【0030】

（遺伝子導入用イネカルの誘導）

完熟したイネ種子は、籾殻を剥離した後、70%エチルアルコールで10分間、3%次亜塩素酸ナトリウムで1時間殺菌する。殺菌後、種子は滅菌水で3回洗浄し1g/lのcasamino酸、30g/lのショ糖、2mg/lの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）、2g/lのジェランガムを含んだpH5.8のN6培地（2N6培地）に置床し、28℃、暗黒下で3～5週間培養する。

【0031】

(イネカルスへの遺伝子導入)

上記で誘導したイネカルスは、大きさが1～3 mm径のものを再び2 N 6 培地に置床し、28℃、暗黒下で3～4日培養する。これにより、カルス細胞の分裂活性を高めることができる。遺伝子導入はこの培養したカルスとY E P 培地で増殖した各コンストラクトを導入したアグロバクテリウム液（菌の濃度をOD 6 6 0 nmで測定して0.1になるように希釈したもの）とを混ぜ合わせ感染させることで行う。その後カルスは25℃、暗黒下で3日間培養する。培養後、カルスは1 mg / 4 ml 濃度のクラフォラン水溶液でカルス表面に付いた余分な菌を数回洗浄殺菌し、滅菌したキムタオルなどで拭き取った後、250 mg / l のクラフォラン、10 mg / l のハイグロマイシン B を含む2 N 6 培地（一次選抜培地）に置床し、28℃、暗黒下で1週間培養する。

【0032】

(形質転換カルスの選抜と植物体の再分化)

クラフォランを含む培地で培養したカルスは、ハイグロマイシン B を30 mg / l に増やした培地（二次選抜培地）に置床し、28℃、暗黒下で3週間培養する。その後、カルスはショ糖30 g / l、ソルビトール30 g / l、c a s a m i n o 酸2 g / l、M E S 緩衝剤11 g / l、ナフタレン酢酸（N A A）2 mg / l、カイネチン1 mg / l、クラフォラン250 mg / l、ハイグロマイシン B 30 mg / l、ジェランガム4 g / l を含むp H 5.8のMS培地（再分化誘導培地）に移し、28℃、明所で3週間培養する。遺伝子の導入されたカルスは、グリーンスポットを形成し、そこから芽と根が分化してくる。分化したカルスは、更に植物ホルモンを抜いた、ショ糖30 g / l、クラフォラン250 mg / l、ハイグロマイシン B 30 mg / l、寒天8 g / l を含むp H 5.8のMS培地（植物体形成培地）に移し、28℃、明所で数週間培養することで、植物体をさらに大きく育成する。

【0033】

(形質転換イネ植物体の育成と種子形成)

再分化したイネは、シャーレ内で約4～5 cm位の大きさ（草丈）になったら

育苗用土壌の入ったプランターに移し換え、照度が約2万ルクス位の人工気象機内で28℃の温度条件で第4葉から5葉が展開するまで育成する。その後、幼苗は更に適度に肥料を加えた黒土を入れたワグネルポットに移し温室内で種子が稔るまで育成させる。再分化した当代の植物体は T_0 世代であり、この植物体から取れる種子を T_1 世代とすると T_2 世代～ T_3 世代まで育成させる。実際の農地で栽培する場合には、更に世代を重ね種々の安全性評価試験を行ない、安全性を確認した後、市場に出す必要がある。

【0034】

(形質転換イネからのプロリン抽出とその濃度測定)

プロリンは、 T_2 世代あるいは T_3 世代の形質転換イネの幼苗(第4葉が展開したもの)の葉から抽出する。人工気象機内で育成したイネ幼苗の葉はハサミなどで約200mg分切り取り、乳鉢で液体窒素を加えパウダー状になるまで磨りつぶす。パウダー状になったサンプルは、純水を加えホモジナイザーなどを用いてさらに磨砕する。粉碎したサンプルは、97℃で6分間加熱した後、氷冷し、4℃で約17,000×G、10分間遠心して上清を分離する。得られた上清は、最終濃度が5%になるようにトリクロロ酢酸を加え混ぜ合わせ、再び4℃で約17,000×G、10分間遠心してタンパク質を沈殿させる。適合溶質としてのプロリンは、この時の上清に含まれており、濃度は液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定する。プロリンの定性定量は各種アミノ酸の標品を一定の濃度に溶かしたものをあらかじめHPLCで測定しておき、そのリテンションタイムをもとに換算することで実際の遺伝子組換えイネの葉に含まれるプロリン量を定量する。

【0035】

図2は、各種遺伝子を導入した組換えイネのストレスを与えていない時のプロリン含量を示している。左端の白抜きのグラフは、プロリン関連遺伝子を組み込んでいない対照を、右側5つの黒塗りで示したグラフはプロリン関連遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えイネの各系統をそれぞれ示している。プロリン量は導入した遺伝子の種類により異なることが認められる。

【0036】

左から2列目のイネのP5CS遺伝子(OsP5CS)をアンチセンスに導入した(図1に示すB)ものは、ほとんど蓄積しないことがわかる。左から3列目のシロイヌナズナのP5CS遺伝子(AtP5CS)をセンスに導入した(図1に示すA)ものは、対照に対してプロリンの蓄積量が増加していることが認められる。同様に、左から4列目および5列目のシロイヌナズナのProDH遺伝子(AtProDH)をアンチセンスに導入した(図1に示すC)ものおよびイネのP5CS遺伝子(OsP5CS)をセンスに導入した(図1に示すA)ものは、それぞれ、対照に対してプロリンの蓄積量が増加していることが認められる。これらに対して、右端のイネのP5CS遺伝子(OsP5CS)をセンスに、シロイヌナズナのProDH遺伝子(AtProDH)をアンチセンスに導入したものは、上記の1種類の遺伝子を導入したものに比べて、蓄積するプロリン量がかなり高い(高いもので対照に対して100倍以上)ことが認められる。そして遺伝子をセンスに導入したものではAtP5CS(左から3列目)よりもOsP5CS(左から5列目)の方がプロリン蓄積にはやや効果のあることが認められる。

【0037】

(耐塩性試験と遺伝子組換えイネの耐塩性の向上)

図3は、図2の右側4列に示すプロリン蓄積が認められた遺伝子組換えイネを数系統用いて、250mMの濃度(海水の塩濃度の約半分)で耐塩性試験を行った結果を示している。白抜きのグラフは、プロリン関連遺伝子を組み込んでいない対照を、黒塗りで示したグラフが遺伝子組換えイネを表している。耐塩性試験は、公知の生存率を指標にした試験方法(特開平09-266726号、発明の名称:植物の耐塩性の簡易評価方法)に準じておこなった。プロリン関連の遺伝子を導入していない対照は塩処理3日ですべて枯死してしまうのに対して、プロリンを蓄積する組換えイネは3日目で95%、5日処理しても65%と高い生存率を示すことが認められる。このことから、イネを遺伝子組換えによりプロリン蓄積能力を高めることで耐塩性を向上させることができる。

【0038】

従って、本発明により作成されたイネ科作物は、更に安全性評価など詳細な解

析を進め品種化すれば、将来、塩類の集積した土壌や砂漠化した土壌において栽培が可能となり食料生産を向上させることが期待できる。また、発展途上国における人口増加にも対処できることが大いに期待できる。

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

本発明によって、プロリン蓄積能力を高めた遺伝子組換えイネ科植物を作成することが可能になった。また、本方法により作成したイネ科植物はプロリン蓄積量が高まったことにより、耐塩性レベルを向上させることが可能となった。

[配列表]

<110> Hitachi, LTD.

RIKEN

Japan International Research Center for Agricultural Science

Bio-oriented Technology Research Advancement Institute (BRAIN)

<120> Transgenic rice plant and its family with environmental stress resistant by proline accumulation of high level and its production.

<130> NT01P0353

<160> 3

<210> 1

<211> 2549

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

<220>

<221> CDS

<222> 99..2249

<300>

<301> Yumiko Igarashi, Yoshu Yoshiba, Yukika Sanada, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Keishiro Wada, Kazuo Shinozaki

<302> Characterization of the gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance

nce in *Oryza sativa* L.

<303> Plant Molecular biology

<304> 33

<306> 857-865

<307> 1996-12-03

<308> D49714

<309> 1995-03-16

<400> 1

gcggctgcgg cggcaaggcg gcgagacgtg ggagagggat ttacaggtag agggagaggg 60

tggaggagga gaggctgagg ctaggaagcg gtttcgcc atg gcg agc gtc gac ccg 116

Met Ala Ser Val Asp Pro

1

5

tcc cgg agc ttc gtg agg gac gtg aag cgc gtc atc atc aag gtg ggc 164

Ser Arg Ser Phe Val Arg Asp Val Lys Arg Val Ile Ile Lys Val Gly

10

15

20

act gca gtt gtc tcc aga caa gat gga aga ttg gct ttg ggc agg gtt 212

Thr Ala Val Val Ser Arg Gln Asp Gly Arg Leu Ala Leu Gly Arg Val

25

30

35

gga gct ctg tgc gag cag gtt aag gaa ctg aac tct tta gga tac gaa 260

Gly Ala Leu Cys Glu Gln Val Lys Glu Leu Asn Ser Leu Gly Tyr Glu

40

45

50

gtg att ttg gtc acc tca ggt gct gtt gga gtg ggg cga cag cga ctt 308

Val Ile Leu Val Thr Ser Gly Ala Val Gly Val Gly Arg Gln Arg Leu

55

60

65

70

agg tac cgg aag ctt gtc aat agc agc ttt gct gat ctg caa aag cca 356

Arg Tyr Arg Lys Leu Val Asn Ser Ser Phe Ala Asp Leu Gln Lys Pro

75

80

85

cag atg gag tta gat gga aag gct tgt gcc gct gtt ggt cag agt gga 404

Gln Met Glu Leu Asp Gly Lys Ala Cys Ala Ala Val Gly Gln Ser Gly

90

95

100

ctg atg gct ctt tac gat atg ttg ttt aac caa ctg gat gtc tcg tca 452

Leu Met Ala Leu Tyr Asp Met Leu Phe Asn Gln Leu Asp Val Ser Ser

105

110

115

tct caa ctt ctt gtc acc gac agt gat ttt gag aac cca aag ttc cgg 500

Ser Gln Leu Leu Val Thr Asp Ser Asp Phe Glu Asn Pro Lys Phe Arg

120

125

130

gag caa ctc act gaa act gtt gag tca tta tta gat ctt aaa gtt ata 548

Glu Gln Leu Thr Glu Thr Val Glu Ser Leu Leu Asp Leu Lys Val Ile

135

140

145

150

cca ata ttt aat gaa aat gat gcc atc agc act aga aag gct cca tat 596

Pro Ile Phe Asn Glu Asn Asp Ala Ile Ser Thr Arg Lys Ala Pro Tyr

155

160

165

gag gat tca tct ggt ata ttc tgg gat aat gac agt tta gca gga ctg 644

Glu Asp Ser Ser Gly Ile Phe Trp Asp Asn Asp Ser Leu Ala Gly Leu

170

175

180

ttg gca ctg gaa ctg aaa gct gat ctc ctt att ctg ctc agt gat gtg 692

Leu Ala Leu Glu Leu Lys Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu Ser Asp Val

185

190

195

gat ggg ttg tat agt ggt cca cca agt gaa cca tca tca aaa atc ata 740

Asp Gly Leu Tyr Ser Gly Pro Pro Ser Glu Pro Ser Ser Lys Ile Ile

200

205

210

cac act tat att aaa gaa aag cat cag caa gaa atc act ttt gga gac 788

His Thr Tyr Ile Lys Glu Lys His Gln Gln Glu Ile Thr Phe Gly Asp

215

220

225

230

aaa tct cgt gta ggt aga gga ggc atg aca gca aaa gtg aag gct gct 836

Lys Ser Arg Val Gly Arg Gly Gly Met Thr Ala Lys Val Lys Ala Ala

235

240

245

gtc ttg gct tca aat agc ggc aca cct gtg gtt att aca agt ggg ttt 884

Val Leu Ala Ser Asn Ser Gly Thr Pro Val Val Ile Thr Ser Gly Phe

250

255

260

gaa aat cgg agc att ctt aaa gtt ctt cat ggg gaa aaa att ggt act 932

Glu Asn Arg Ser Ile Leu Lys Val Leu His Gly Glu Lys Ile Gly Thr

265

270

275

ctc ttt cac aag aat gcg aat ttg tgg gaa tca tct aag gat gtt agt 980

Leu Phe His Lys Asn Ala Asn Leu Trp Glu Ser Ser Lys Asp Val Ser

280

285

290

act cgt gag atg gct gtt gcc gca aga gat tgt tca agg cat cta cag 1028

Thr Arg Glu Met Ala Val Ala Ala Arg Asp Cys Ser Arg His Leu Gln

295

300

305

310

aat ttg tca tca gag gaa cga aaa aag ata ttg cta gat gtt gca gat 1076

Asn Leu Ser Ser Glu Glu Arg Lys Lys Ile Leu Leu Asp Val Ala Asp

315

320

325

gct ttg gag gca aat gag gat tta ata agg tct gag aat gaa gct gat 1124

Ala Leu Glu Ala Asn Glu Asp Leu Ile Arg Ser Glu Asn Glu Ala Asp

330

335

340

gta gct gcg gcc caa gtt gct gga tat gag aag cct ttg gtt gct aga 1172

Val Ala Ala Ala Gln Val Ala Gly Tyr Glu Lys Pro Leu Val Ala Arg

345

350

355

ttg act ata aaa cca gga aag ata gca agc ctt gca aaa tct att cgt 1220

Leu Thr Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ala Ser Leu Ala Lys Ser Ile Arg

360

365

370

acc ctt gca aat atg gaa gac cct ata aac cag ata ctt aaa aag aca 1268

Thr Leu Ala Asn Met Glu Asp Pro Ile Asn Gln Ile Leu Lys Lys Thr

375

380

385

390

gag gtt gct gat gat tta gtt ctt gag aaa aca tct tgc cca tta ggt 1316

Glu Val Ala Asp Asp Leu Val Leu Glu Lys Thr Ser Cys Pro Leu Gly

395

400

405

gtt ctc tta att gtt ttt gag tcc cga cct gat gcc ttg gtt cag att 1364

Val Leu Leu Ile Val Phe Glu Ser Arg Pro Asp Ala Leu Val Gln Ile

410	415	420	
gca tct ttg gca att cga agt ggt aat ggt ctt ctc cta aaa ggt gga			1412
Ala Ser Leu Ala Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Leu Leu Lys Gly Gly			
425	430	435	
aaa gaa gct atc aga tca aac acg ata ttg cat aag gtt ata act gat			1460
Lys Glu Ala Ile Arg Ser Asn Thr Ile Leu His Lys Val Ile Thr Asp			
440	445	450	
gct att cct cgt aat gtt ggt gaa aaa ctt att ggc ctt gtt aca act			1508
Ala Ile Pro Arg Asn Val Gly Glu Lys Leu Ile Gly Leu Val Thr Thr			
455	460	465	470
aga gat gag atc gca gat ttg cta aag ctt gat gat gtc att gat ctt			1556
Arg Asp Glu Ile Ala Asp Leu Leu Lys Leu Asp Asp Val Ile Asp Leu			
475	480	485	
gtc act cca aga gga agt aat aag ctt gtc tct caa atc aag gcg tca			1604
Val Thr Pro Arg Gly Ser Asn Lys Leu Val Ser Gln Ile Lys Ala Ser			
490	495	500	
act aag att cct gtt ctt ggg cat gct gat ggt ata tgc cac gta tat			1652
Thr Lys Ile Pro Val Leu Gly His Ala Asp Gly Ile Cys His Val Tyr			
505	510	515	
att gac aaa tca gct gac atg gat atg gca aaa ctt att gta atg gat			1700
Ile Asp Lys Ser Ala Asp Met Asp Met Ala Lys Leu Ile Val Met Asp			
520	525	530	

gca aaa act gat tac cca gca gcc tgc aat gca atg gag acc tta cta 1748

Ala Lys Thr Asp Tyr Pro Ala Ala Cys Asn Ala Met Glu Thr Leu Leu

535

540

545

550

gtt cat aag gat ctt atg aag agt cca ggc ctt gac gac ata tta gta 1796

Val His Lys Asp Leu Met Lys Ser Pro Gly Leu Asp Asp Ile Leu Val

555

560

565

gca cta aaa aca gaa gga gtt aat att tat ggt gga cct att gcg cac 1844

Ala Leu Lys Thr Glu Gly Val Asn Ile Tyr Gly Gly Pro Ile Ala His

570

575

580

aaa gct ctg gga ttt cca aaa gct gtt tca ttt cat cat gag tat agt 1892

Lys Ala Leu Gly Phe Pro Lys Ala Val Ser Phe His His Glu Tyr Ser

585

590

595

tct atg gcc tgc act gtt gag ttt gtt gat gat gtt caa tca gca att 1940

Ser Met Ala Cys Thr Val Glu Phe Val Asp Asp Val Gln Ser Ala Ile

600

605

610

gac cat att cat cgt tat gga agt gct cat aca gat tgt atc gtc act 1988

Asp His Ile His Arg Tyr Gly Ser Ala His Thr Asp Cys Ile Val Thr

615

620

625

630

aca gat gat aag gta gca gag act ttt cta cgc aga gtt gat agt gct 2036

Thr Asp Asp Lys Val Ala Glu Thr Phe Leu Arg Arg Val Asp Ser Ala

635

640

645

gct gta ttt cat aat gca agt acg aga ttc tct gat ggg gct cgt ttt 2084
Ala Val Phe His Asn Ala Ser Thr Arg Phe Ser Asp Gly Ala Arg Phe
650 655 660

gga ttg ggt gct gag gtt ggc ata agc aca ggg cgt atc cat gcc cgt 2132
Gly Leu Gly Ala Glu Val Gly Ile Ser Thr Gly Arg Ile His Ala Arg
665 670 675

gga cca gtg ggt gtt gaa ggt ctc tta act aca cga tgg atc ttg cga 2180
Gly Pro Val Gly Val Glu Gly Leu Leu Thr Thr Arg Trp Ile Leu Arg
680 685 690

gga cgt ggg caa gtg gtg aat ggt gac aag gat gtc gtg tac acc cat 2228
Gly Arg Gly Gln Val Val Asn Gly Asp Lys Asp Val Val Tyr Thr His
695 700 705 710

aag agt ctt cct ttg caa tga ggtcaaatgc tccttttagc ctgttcagga 2279
Lys Ser Leu Pro Leu Gln
715

gtaggtgaat atccttttaa gaatggattg actactttat tttgtcatct tgtacaagca 2339

tcctattgcg gcattccgat ggattattga ttttgggggt tcccactttc aaatgtgaca 2399

ccaaaaataa attcatcagt tctgagagca agattttgga ggttcagctt ctccatgtaa 2459

taagtaaatt cagttctgag aacttgtgta ccaacgcgct atgttgcttg taatgagcga 2519

tactaacatc tgtgattgca catatactaa 2549

<210> 2

<211> 2571

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> 107...2260

<301> Yoshu Yoshida, Tomohiro Kiyasue, Takeshi Katagiri, Hiroko Ueda, Tsuyoshi Mizoguchi, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Keishiro Wada, Yoshinori Harada, Kazuo Shinozaki

<302> Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress.

<303> The Plant Journal

<304> 7

<305> 5

<306> 751-760

<307> 1995-01-20

<308> D32138

<309> 1994-07-12

<400> 2

ctgatattta ttttcttacc ttaaatacga cgggtgcttca ctgagtccga ctcagttaac 60

tcgttcctct ctctgtgtgt gggttttgta gacgacgacg acgata atg gag gag 115

Met Glu Glu

1

cta gat cgt tca cgt gct ttt gcc aga gac gtc aaa cgt atc gtc gtt 163

Leu Asp Arg Ser Arg Ala Phe Ala Arg Asp Val Lys Arg Ile Val Val

山打根 0 0 0 1 0 1 0 0 5 0 0

320

١ ١

山打根 0 0 0 1 0 1 0 0 5 0 0

335

١ ١

山打根 0 0 0 1 0 1 0 0 5 0 0

350

١ ١

山打根 0 0 0 1 0 1 0 0 5 0 0

370

١ ١

山打根 0 0 0 1 0 1 0 0 5 0 0

385

١ ١

山打根 0 0 0 1 0 1 0 0 5 0 0

400

١ ١

山打根 0 0 0 1 0 1 0 0 5 0 0

415

١ ١

Ile Asp Lys Gln Asn Gly Lys Ile Glu Phe Ala Gln Leu Tyr Gly Met

420

425

430

tca gat gca ttg tcc ttc ggg tta aag aga gca ggg ttc aat gtt agc 1462

Ser Asp Ala Leu Ser Phe Gly Leu Lys Arg Ala Gly Phe Asn Val Ser

435

440

445

450

aag tac atg ccg ttt gga ccc gtc gca acc gct ata ccg tat ctt ctc 1510

Lys Tyr Met Pro Phe Gly Pro Val Ala Thr Ala Ile Pro Tyr Leu Leu

455

460

465

cga cgc gct tat gag aac cgg gga atg atg gcc acc gga gct cat gac 1558

Arg Arg Ala Tyr Glu Asn Arg Gly Met Met Ala Thr Gly Ala His Asp

470

475

480

cgt caa ctc atg agg atg gaa ctt aag agg aga tta atc gcc ggg att 1606

Arg Gln Leu Met Arg Met Glu Leu Lys Arg Arg Leu Ile Ala Gly Ile

485

490

495

gcg taaagagaga gtatggagcc attaaatgaa attgggaaat gtagatgaat 1659

Ala

aaatttcttc tatgtagttt aagaaattga aaacaaaaaa ttataatata agaaatggag 1719

taggtaagaa catttcctgt ggctaaatat tttcatgag ggactatggt tttactatca 1779

atatatcatt cacaaatgta tattcacctt atcaataaaa atgcttttta cttt 1833

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プロリン合成系酵素 P 5 C S 遺伝子とプロリン代謝系酵素 P r o D H 遺伝子およびそのアンチセンス遺伝子を組み込んだイネ用ベクターを示す図。

【図 2】

図 1 で示したベクターを遺伝子操作により導入したイネのストレスを与えていない時のプロリン蓄積量を示す図。

【図 3】

図 2 で示したプロリン関連遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えイネの耐塩性を示した図。

Val Ala Arg Leu Val Met Thr Pro Gly Lys Ile Ser Ser Leu Ala Ala

360

365

370

tca gtt cgt aag cta gct gat atg gaa gat cca atc ggc cgt gtt tta 1267

Ser Val Arg Lys Leu Ala Asp Met Glu Asp Pro Ile Gly Arg Val Leu

375

380

385

aag aaa aca gag gtg gca gat ggt ctt gtc tta gag aag acc tca tca 1315

Lys Lys Thr Glu Val Ala Asp Gly Leu Val Leu Glu Lys Thr Ser Ser

390

395

400

cca tta ggc gta ctt ctg att gtt ttt gaa tcc cga cct gat gca ctt 1363

Pro Leu Gly Val Leu Leu Ile Val Phe Glu Ser Arg Pro Asp Ala Leu

405

410

415

gta cag ata gct tca ctt gcc atc cgt agt gga aat ggt ctt ctg ctg 1411

Val Gln Ile Ala Ser Leu Ala Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Leu Leu

420

425

430

435

aag ggt gga aag gag gcc cgg cga tca aat gct atc tta cac aag gtg 1459

Lys Gly Gly Lys Glu Ala Arg Arg Ser Asn Ala Ile Leu His Lys Val

440

445

450

atc act gat gca att cca gag act gtt ggg ggt aaa ctc att gga ctt 1507

Ile Thr Asp Ala Ile Pro Glu Thr Val Gly Gly Lys Leu Ile Gly Leu

455

460

465

gtg act tca aga gaa gag att cct gat ttg ctt aag ctt gat gac gtt 1555

Val Thr Ser Arg Glu Glu Ile Pro Asp Leu Leu Lys Leu Asp Asp Val

470

475

480

atc gat ctt gtg atc cca aga gga agc aac aag ctt gtt act cag ata 1603

Ile Asp Leu Val Ile Pro Arg Gly Ser Asn Lys Leu Val Thr Gln Ile

485

490

495

aaa aat act aca aaa atc cct gtg cta ggt cat gct gat gga atc tgt 1651

Lys Asn Thr Thr Lys Ile Pro Val Leu Gly His Ala Asp Gly Ile Cys

500

505

510

515

cat gta tat gtc gac aag gct tgt gat acg gat atg gca aag cgc ata 1699

His Val Tyr Val Asp Lys Ala Cys Asp Thr Asp Met Ala Lys Arg Ile

520

525

530

gtt tct gat gca aag ttg gac tat cca gca gcc tgt aat gcg atg gaa 1747

Val Ser Asp Ala Lys Leu Asp Tyr Pro Ala Ala Cys Asn Ala Met Glu

535

540

545

acc ctt ctt gtg cat aag gat cta gag cag aat gct gtg ctt aat gag 1795

Thr Leu Leu Val His Lys Asp Leu Glu Gln Asn Ala Val Leu Asn Glu

550

555

560

ctt att ttt gct ctg cag agc aat gga gtc act ttg tat ggt gga cca 1843

Leu Ile Phe Ala Leu Gln Ser Asn Gly Val Thr Leu Tyr Gly Gly Pro

565

570

575

agg gca agt aag ata ctg aac ata cca gaa gca cgg tca ttc aac cat 1891

Arg Ala Ser Lys Ile Leu Asn Ile Pro Glu Ala Arg Ser Phe Asn His

580

585

590

595

gag tac tgt gcc aag gct tgc act gtt gaa gtt gta gaa gac gtt tat 1939

Glu Tyr Cys Ala Lys Ala Cys Thr Val Glu Val Val Glu Asp Val Tyr

600

605

610

ggt gct ata gat cac att cac cga cat ggg agt gca cac aca gac tgc 1987

Gly Ala Ile Asp His Ile His Arg His Gly Ser Ala His Thr Asp Cys

615

620

625

att gtg aca gag gat cac gaa gtt gca gag cta ttc ctt cgc caa gtg 2035

Ile Val Thr Glu Asp His Glu Val Ala Glu Leu Phe Leu Arg Gln Val

630

635

640

gat agc gct gct gtg ttc cac aac gcc agc aca aga ttc tca gat ggt 2083

Asp Ser Ala Ala Val Phe His Asn Ala Ser Thr Arg Phe Ser Asp Gly

645

650

655

ttc cga ttt gga ctt ggt gca gag gtg ggg gta agc acg ggc agg atc 2131

Phe Arg Phe Gly Leu Gly Ala Glu Val Gly Val Ser Thr Gly Arg Ile

660

665

670

675

cat gct cgt ggt cca gtc ggg gtc gaa gga tta ctt aca acg aga tgg 2179

His Ala Arg Gly Pro Val Gly Val Glu Gly Leu Leu Thr Thr Arg Trp

680

685

690

ata atg aga gga aaa gga caa gtt gtc gac gga gac aat gga att gtt 2227

Ile Met Arg Gly Lys Gly Gln Val Val Asp Gly Asp Asn Gly Ile Val

695

700

705

tac acc cat cag gac att ccc atc caa gct taaacaagac ttccgagtgt 2277

Tyr Thr His Gln Asp Ile Pro Ile Gln Ala

710

715

gtgtttgtgt atttggttga gacttgagga gagacacaga ggaggatggg cttttttgtt 2337

tcctctctgc ttagtactca taccctatca ttattattat tactactact tattattgaa 2397

accctcgctt atgtagtggg ttgatttag ggtaggatt gcaccaaaaa taagatccac 2457

tttaccactt agtcttgctc ataagtacga tgaagaacat ttaattagct tctcttcttg 2517

tcattgtaag ctacctacac atttctgac tttatcaaga tactactact ttcc 2571

<210> 3

<211> 1833

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> 113...1612

<301> Tomohiro Kiyasue, Yoshu Yoshiba, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki

<302>Title : A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis.

<303> The Plant Cell

<304> 8

<306> 1323-1335

<307> 1996-05-27

<308> D83025

<309> 1995-12-25

<400> 3

agcgttttaga aaaaaacagc gataaaaccg aaacatcaag caaacaaaaa aaaaagagaa 60

gagaaattat tttttttgt tttcgttttc aaaaacaaaa tctttgaatt tt atg gca 118

Met Ala

1

acc cgt ctt ctc cga aca aac ttt atc cgg cga tct tac cgt tta ccc 166

Thr Arg Leu Leu Arg Thr Asn Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Arg Leu Pro

5

10

15

gct ttt agc ccg gtg ggt cct ccc acc gtg act gct tcc acc gcc gtc 214

Ala Phe Ser Pro Val Gly Pro Pro Thr Val Thr Ala Ser Thr Ala Val

20

25

30

gtc ccg gag att ctc tcc ttt gga caa caa gca ccg gaa cca cct ctt 262

Val Pro Glu Ile Leu Ser Phe Gly Gln Gln Ala Pro Glu Pro Pro Leu

35

40

45

50

cac cac cca aaa ccc acc gag caa tct cac gat ggt ctc gat ctc tcc 310

His His Pro Lys Pro Thr Glu Gln Ser His Asp Gly Leu Asp Leu Ser

55

60

65

gat caa gcc cgt ctt ttc tcc tct atc cca acc tct gat ctc ctc cgt 358

Asp Gln Ala Arg Leu Phe Ser Ser Ile Pro Thr Ser Asp Leu Leu Arg

70

75

80

tcc acc gcc gtg ttg cat gcg gcg gcg ata ggt cct atg gtc gac cta 406

Ser Thr Ala Val Leu His Ala Ala Ala Ile Gly Pro Met Val Asp Leu

85

90

95

ggg acg tgg gtc atg agc tct aaa ctt atg gac gct tcg gtg acg cgt 454

Gly Thr Trp Val Met Ser Ser Lys Leu Met Asp Ala Ser Val Thr Arg

100

105

110

ggc atg gtt tta ggg ctt gtg aaa agt acg ttt tat gac cat ttt tgc 502

Gly Met Val Leu Gly Leu Val Lys Ser Thr Phe Tyr Asp His Phe Cys

115

120

125

130

gcc ggt gaa gat gcc gac gca gcc gct gag cgc gtg aga agc gtt tat 550

Ala Gly Glu Asp Ala Asp Ala Ala Ala Glu Arg Val Arg Ser Val Tyr

135

140

145

gaa gct act ggt ctt aaa ggg atg ctt gtc tat ggc gtc gaa cac gcc 598

Glu Ala Thr Gly Leu Lys Gly Met Leu Val Tyr Gly Val Glu His Ala

150

155

160

gat gac gct gta tct tgt gat gat aac atg caa caa ttc att cga acc 646

Asp Asp Ala Val Ser Cys Asp Asp Asn Met Gln Gln Phe Ile Arg Thr

165

170

175

att gaa gct gcc aaa tct tta cca aca tct cac ttt agc tca gtg gtt 694

Ile Glu Ala Ala Lys Ser Leu Pro Thr Ser His Phe Ser Ser Val Val

180

185

190

gtg aag ata act gcc att tgt cca att agt ctt ctg aaa cga gtg agc 742

Val Lys Ile Thr Ala Ile Cys Pro Ile Ser Leu Leu Lys Arg Val Ser

195

200

205

210

gat ctg ctg cgg tgg gaa tac aaa agt ccg aac ttc aaa ctc tca tgg 790

Asp Leu Leu Arg Trp Glu Tyr Lys Ser Pro Asn Phe Lys Leu Ser Trp

215

220

225

aag ctc aaa tcg ttt ccg gtt ttc tcc gaa tcg agt cct ctc tac cac 838

Lys Leu Lys Ser Phe Pro Val Phe Ser Glu Ser Ser Pro Leu Tyr His

230

235

240

aca aac tca gaa ccg gaa ccg tta acc gcg gaa gaa gaa agg gag ctc 886

Thr Asn Ser Glu Pro Glu Pro Leu Thr Ala Glu Glu Glu Arg Glu Leu

245

250

255

gaa gca gct cat gga agg att caa gaa atc tgt agg aaa tgc caa gag 934

Glu Ala Ala His Gly Arg Ile Gln Glu Ile Cys Arg Lys Cys Gln Glu

260

265

270

tcc aat gta cca ttg ttg att gat gcg gaa gac aca atc ctc caa ccc 982

Ser Asn Val Pro Leu Leu Ile Asp Ala Glu Asp Thr Ile Leu Gln Pro

275

280

285

290

gcg atc gat tac atg gct tat tca tcg gcg atc atg ttc aat gct gac 1030

Ala Ile Asp Tyr Met Ala Tyr Ser Ser Ala Ile Met Phe Asn Ala Asp

295

300

305

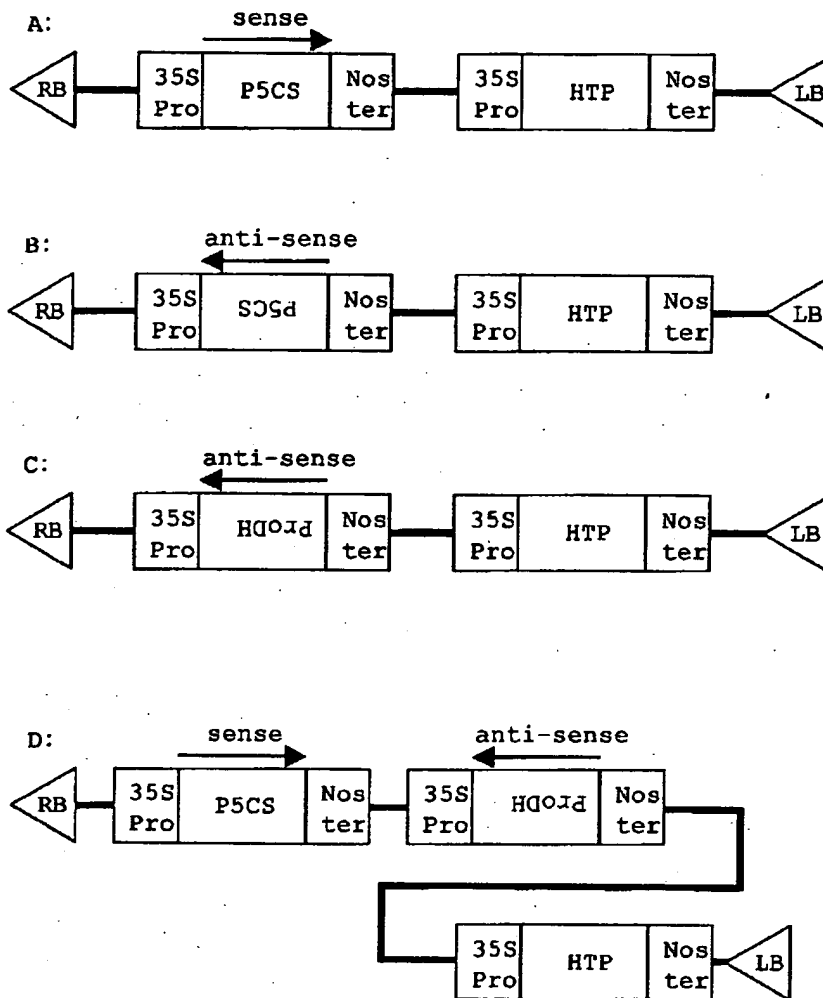
aaa gac cga cca atc gtt tac aac acg att cag gcg tac ttg aga gac 1078

【書類名】

図面

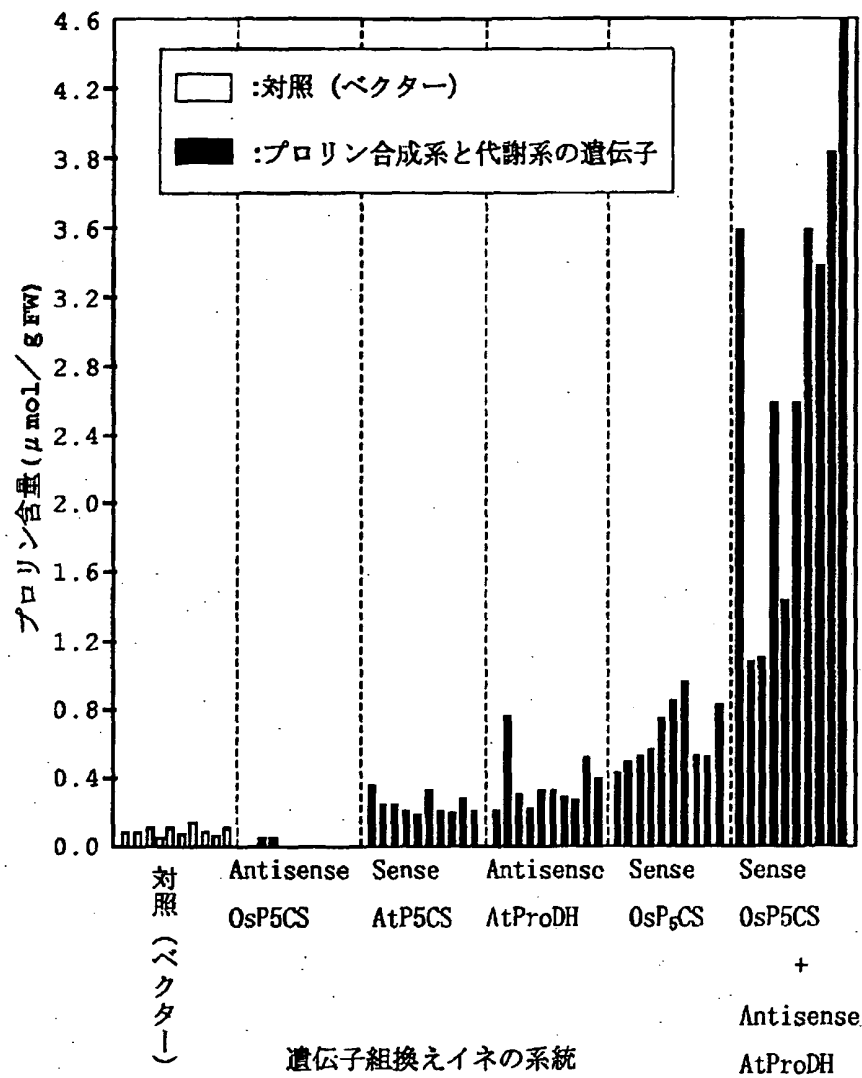
【図1】

図 1



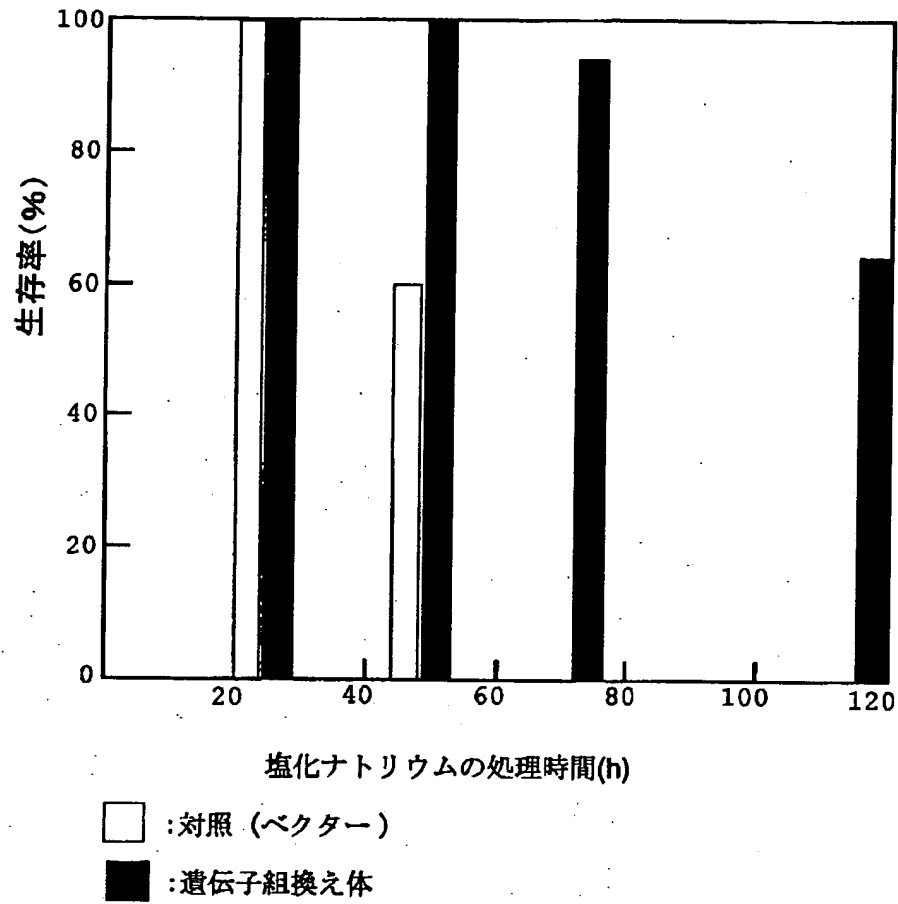
【図2】

図 2



【図3】

図 3



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プロリン蓄積能力を高め、これにより耐塩性レベルの向上した形質転換イネ科植物を得る。

【解決手段】 イネのP5CS（デルタ¹-ピロリン-5-カルボン酸合成酵素）遺伝子またはシロイヌナズナのP5CS遺伝子とシロイヌナズナのProDH（プロリン脱水素酵素）遺伝子のアンチセンス（逆向きな塩基配列を持つ）遺伝子とを遺伝子操作技術を利用してイネ科植物に導入する。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日 1990年 8月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名 株式会社日立製作所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000195568]

1. 変更年月日 2001年 5月15日

[変更理由] 住所変更

住 所 埼玉県さいたま市日進町1丁目40番地2

氏 名 生物系特定産業技術研究推進機構

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501174550]

1. 変更年月日 2001年 4月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市大わし1-1

氏 名 独立行政法人 国際農林水産業研究センター

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名 理化学研究所